

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Ivona Jakša, 864/BPI

**Izolacija amilaze amilolitičke bakterije  
mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus*  
DSM 20531<sup>T</sup> ion-izmjenjivačkom  
kromatografijom**

*Ovaj je diplomski rad izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Anite Slavica.*

*Diplomski rad je izrađen u okviru projekta "Proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti (SPECH-LRM, 9158)" voditelja prof. dr. sc. Božidara Šanteka. Provedbu ovog programa i projekta podupire Hrvatska zaklada za znanost.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Aniti Slavica, svojoj mentorici, koja mi je savjetima, strpljenjem, susretljivošću i razumijevanjem uvelike pomogla pri izvedbi eksperimentalnog dijela i izradi pisanog dijela diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Božidaru Šanteku, voditelju projekta "Proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina na principima ekološke i ekonomske održivosti (SPECH-LRM, 9158)".*

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Renati Teparić na sugestijama i pomoći tijekom izvođenja kromatografije i elektroforeze.*

*Veliko hvala svim članovima ovog Laboratorija na susretljivosti i pomoći.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci koju su mi pružali tijekom studiranja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Izolacija amilaze amilolitičke bakterije mliječne kiseline

*Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> ion-izmjenjivačkom kromatografijom

Ivona Jakša, 864/BPI

**Sažetak:** Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> uzgojena je u MRS podlozi s maltozom kao supstratom u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom pri konstantnoj temperaturi, pH vrijednosti suspenzije i broju okretaja miješala. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni biokinetički parametri za rast biomase i proizvodnju mliječne kiseline s pomoću ovog bakterijskog soja jasno pokazuju da je *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> izvrstan kandidat za industrijsku proizvodnju ove kiseline. Maltoza inducira proizvodnju vanstanične amilaze u relativno visokim koncentracijama i zadovoljavajuće aktivnosti za provođenje izolacije i pročišćavanja ovog enzima. Proizvedena amilaza je izdvojena taloženjem amonijevim sulfatom i to pri 25, 50 i 75% zasićenja. Većina aktivne amilaze izdvojena je pri 75% zasićenja otopine amonijevim sulfatom, pa su ovako dobiveni peleti korišteni za daljnje pročišćavanje izdvojenog enzima. Pročišćavanje resuspendirane amilaze provedeno je ion-izmjenjivačkom kromatografijom. Od ukupno pet proteinskih pikova odijeljenih tijekom eluiranja proteina s ion-izmjenjivačke kolone pomoću otopine natrijeva klorida, samo tri proteinske frakcije imaju amilolitičku aktivnost. Najmanju specifičnu aktivnost ima proteinska frakcija eluirana pri 0,5 mol L<sup>-1</sup> NaCl (47 U mg<sup>-1</sup>), dok veću specifičnu aktivnost imaju proteinske frakcije eluirane pri 0,4 (62 U mg<sup>-1</sup>) i 0,6 mol L<sup>-1</sup> natrijevog klorida u puferu (263 U mg<sup>-1</sup>). Sve tri ion-izmjenjivačkom kromatografijom izdvojene frakcije amilaze sadrže nekoliko proteinskih vrpca, kako je to utvrđeno SDS-PAGE metodom, i to molekulskih masa između 50 i 94 kDa.

**Glavne riječi:** amilolitička bakterija mliječne kiseline, *Lactobacillus amylovorus*, indukcija amilaze, taloženje proteina, ion-izmjenjivačka kromatografija

**Rad sadrži:** 39 stranica, 12 slika, 10 tablica, 18 literaturnih referenci, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** prof. dr. sc. Anita Slavica,

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Renata Teparić
2. Prof. dr. sc. Anita Slavica
3. Izv. prof. dr. sc. Tonči Rezić
4. Prof. dr. sc. Blaženka Kos (zamjena)

**Datum obrane:** 21. srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Graduate Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

**Isolation of amylase produced by amylolytic lactic acid bacterium  
*Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> by using ion-exchange chromatography**

Ivona Jakša, 864/BPI

**Abstract** Cultivation of an amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> was conducted in a MRS medium with a maltose as a substrate in a laboratory scale stirred tank bioreactor at a constant temperature, pH value of suspension and a stirrer speed. Biokinetic parameters that were estimated by using experimentally obtained values for the growth and lactic acid production by this bacterial strain clearly shows that *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> is an excellent candidate for an industrial production of the acid. Maltose induces production of extracellular amylase at relatively high concentrations and satisfying activity that are suitable for isolation and purification of the enzyme. Produced amylase was precipitated by ammonium sulfate at a final saturation of 25, 50 and 75%. Majority of active amylase was isolated at the final saturation of ammonium sulfate of 75% and, therefore, obtained pellets were used in further purification of the enzyme. Further purification of resuspended enzyme was accomplished by an ion-exchange chromatography. Three out of five protein peaks eluted from the column by using sodium chloride possessed amylolytic activity. The lowest activity was determined for the protein fraction eluted by 0,5 mol L<sup>-1</sup> of sodium chloride (47 U mg<sup>-1</sup>), while higher activity was determined for protein fractions eluted by 0,4 (62 U mg<sup>-1</sup>) and 0,6 mol L<sup>-1</sup> of sodium chloride in buffer (263 U mg<sup>-1</sup>). All three active protein fractions contain several protein bands with molecular weight between 50 and 94 kDa, as revealed by SDS-PAGE.

**Key words:** amylolytic lactic acid bacterium, *Lactobacillus amylovorus*, amylase induction, protein precipitation, ion-exchange chromatography

**Thesis contains:** 39 pages, 12 figures, 10 tables, 18 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD Anita Slavica, Full Professor

**Reviewers:**

1. PhD Renata Teparić, Associate Professor
2. PhD Anita Slavica, Full Professor
3. PhD Tonči Rezić, Associate Professor
4. PhD Blaženka Kos, Full Professor

**Paper defended:** 21 July 2017

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	2
2.1. Amilaze	2
2.1.1. Škrob - supstrat za amilaze	2
2.1.2. $\alpha$ – amilaze	3
2.2. Bakterije mliječne kiseline	4
2.2.1. Amilolitičke bakterije mliječne kiseline	5
2.2.2. Amilolitička bakterija mliječne kiseline <i>Lactobacillus amylovorus</i>	5
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	7
3.1. MATERIJALI	7
3.1.1. Mikroorganizam	7
3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge	7
3.1.2.1. Kemikalije za pripravu hranjive MRS-mal <sub>20</sub> podloge za uzgoj ABMK i proizvodnju amilaze	7
3.1.2.2. Kemikalije za pripravu otopina za ion-izmjenjivačku kromatografiju	8
3.1.2.3. Kemikalije za pripravu otopina za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata i detekciju proteina u gelu	9
3.1.2.4. Kemikalije za pripravu otopina za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti	10
3.1.2.5. Kemikalije za pripravu otopina za određivanje koncentracije proteina i aktivnosti enzima	11
3.1.2.6. Kemikalije za taloženja proteina	11
3.1.2.7. Kemikalije za određivanje koncentracije reducirajućih spojeva RS metodom	12
3.1.2.8. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskog soja	12
3.1.3. Aparatura i pribor	13
3.1.3.1. Laboratorijski bioreaktor s miješalom	13
3.1.3.2. Centrifuge	13
3.1.3.3. Spektrofotometri	14
3.1.3.4. Sustav za ion-izmjenjivačku kromatografiju	15
3.1.3.5. Sustav za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)	15
3.1.3.6. Oprema za filtraciju pokretne faze za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i ultrazvučna kupelj	16
3.1.3.7. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti	16
3.1.3.8. Ostala oprema	17
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Priprava hranjivih podloga	17
3.2.2. Priprava cjepiva za uzgoj ABMK u tikvici i laboratorijskom bioreaktoru s miješalom	18
3.2.3. Uzgoj bakterije i indukcija sinteze amilaze u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom	18

3.2.4. Izdvajanje amilaze	19
3.2.4.1. Priprema uzoraka za izdvajanje amilaze i taloženje amonijevim sulfatom	19
3.2.4.2. Ion-izmjenjivačka kromatografija	19
3.2.5. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)	20
3.2.6. Analitičke metode	20
3.2.6.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja ABMK	20
3.2.6.2. Određivanje suhe tvari biomase u uzorcima izuzetima tijekom šaržnog uzgoja ABMK	21
3.2.6.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	21
3.2.6.3.1. Taloženje proteina cinkovim sulfatom	21
3.2.6.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	21
3.2.6.4. Određivanje koncentracije reducirajućih spojeva RS metodom	22
3.2.6.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u	22
3.2.6.6. Određivanje aktivnosti enzima	23
3.2.7. Analiza eksperimentalnih podataka - izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline ABMK <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 <sup>T</sup>	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	26
4.1. Uzgoj amilolitičke bakterije <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531 <sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal <sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom, šaržnim postupkom	26
4.2. Izdvajanje i karakterizacija amilaze	31
<b>5. ZAKLJUČCI</b>	34
<b>6. LITERATURA</b>	35
<b>7. PRILOZI</b>	38



## **1. UVOD**

Amilolitičke bakterije mliječne kiseline zasebna su grupa bakterija mliječne kiseline čiji je metabolički kapacitet istražen u samo nekoliko detalja, pa je stoga i slabo primijenjen. Općenito se ovi tradicionalni industrijski mikroorganizmi koriste prvenstveno u smislu proizvodnje mliječne kiseline i drugih krajnjih proizvoda metabolizma jednostavnih ugljikohidrata i to ponajprije u prehrambenoj industriji. Međutim, metabolička raznovrsnost ovih bakterija obuhvaća znatno više reakcija i to u dosad slabo istraženim uvjetima, koji odgovaraju uvjetima bioprocasa u industrijskom mjerilu. Tako je poznato da određeni sojevi ABMK, kao što je npr. *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, mogu koristiti cijeli spektar različitih supstrata, a posebno valja istaknuti korištenje škroba i škrobnih sirovina kao i nekih proteina kao supstrata (Slavica i sur., 2015; Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011). Osim toga, ovi sojevi mogu rasti u mikroaerofilnim uvjetima pri relativno visokim početnim koncentracijama supstrata (100 g L<sup>-1</sup>) i niskim pH vrijednostima suspenzije (pH 3,0). Nadalje, uzgoj *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> moguće je provesti u laboratorijskim bioreaktorima različite konstrukcije, npr. u biorektoru s miješalom kao i horizontalnom rotirajućem cijevnom biorektoru, ali i različitim postupcima [šaržni, pritočni i (polu)kontinuirani postupak]. Sve pobrojano čini ovaj soj pogodnim za primjenu u industrijskom mjerilu i to u submerznim uzgojima kao i uzgojima na (polu)čvrstim supstratima, kao što je to eksperimentalno potvrđeno (neobjavljeni rezultati).

Amilaze soja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> do sada nisu proizvedene u preparativnom mjerilu, nisu izolirane i pročišćene niti okarakterizirane, pa podaci za ovaj enzim nisu dostupni u znanstvenim radovima niti u bazama podataka. Karakterizacija amilolitičke aktivnosti ovog soja doprinijela bi razumijevanju bioprocasa hidrolize škroba i škrobnih sirovina s pomoću mikroorganizama, ali i primjeni ovog potencijalnog radnog mikroorganizma u bioprocasima u industrijskom mjerilu. Osim toga, ova je amilolitička bakterija potencijalni proizvođač amilaza, čija primjena se brzo širi iz industrije škroba i prehrambene industrije ka farmaceutskoj, biomedicinskoj i analitičkoj primjeni.

Cilj ovog rada bio je uzgojiti amilolitičku bakteriju mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj podlozi u koju je maltoza dodana kao glavni izvor ugljika i energije i definirati učinkovitost odabranog bioprocasa pri relativno niskoj temperaturi. Tako bi se eksperimentalno i to u laboratorijskom mjerilu potvrdila prikladnost ovog soja za primjenu u većem mjerilu. Kako je maltoza induktor amilaze, potrebno je utvrditi može li se pri odabranim uvjetima proizvesti dovoljna koncentracija amilaze i zadovoljavajuća aktivnost ovog enzima, koje bi bile prikladne za provođenje izolacije i pročišćavanja. Primijenit će se dvostupanjski postupak pročišćavanja proizvedenog enzima, koji će se sastojati od taloženja amonijevim sulfatom i ion-izmjenjivačke kromatografije.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Amilaze

Amilaze pripadaju grupi tradicionalno primijenjenih enzima (Gupta i sur., 2003) koji kataliziraju hidrolizu  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozidne veze, kojima su povezane glukozne podjedinice u škrobu i drugim sličnim homopolimerima glukoze. 1811. godine ovu skupinu enzima po prvi put spominje Kirchhoff i to kao prve poznate enzime koji mogu razgraditi škrob (Gupta i sur., 2003).

Amilaze se mogu podijeliti na temelju mehanizma hidrolitičkih reakcija koje kataliziraju i to na:  $\alpha$ -amilaze,  $\beta$ -amilaze i  $\gamma$ -amilaze (glukoamilaze), ali i prema smještaju veza koje mogu hidrolizirati na: endoamilaze i egzoamilaze. Endoamilaze kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza u unutrašnjosti poliglukoznog lanca i u ovoj reakciji nastaju linearni i razgranati oligosaharidi s lancima različite duljine (Gupta i sur., 2003). Egzoamilaze provode hidrolizu glikozidnih veza s nereducirajućih krajeva polimernih ugljikohidrata (Gupta i sur., 2003).

Ovu grupu enzima proizvode biljke, životinje i različiti mikroorganizmi, a upravo mikrobne amilaze iskazuju najviše karakteristika koje su pogodne za primjenu u industrijskom mjerilu. Amilaze su vrlo važan biotehnološki proizvod sa širokom primjenom u prehrambenoj, fermentacijskoj, tekstilnoj industriji i industriji papira.

### 2.1.1. Škrob - supstrat za amilaze

Škrob je polisaharid opće kemijske formule  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , koji se sastoji od amiloze, amilopektina i međustruktura, a sva tri dijela škroba su izgrađena od glukoznih jedinica povezanih glikozidnim vezama (Marić, 2000). Biljke sintetiziraju škrob polimerizacijom glukoze koja je nastala u procesu fotosinteze i pohranjuju ga u velikim količinama u obliku škrobnih zrnaca. Brojni organizmi mogu koristiti ovaj kompleksni ugljikohidrat kao izvor ugljika i energije, ukoliko proizvode enzime potrebne za njegovu razgradnju. Enzimsku hidrolizu škroba kataliziraju  $\alpha$ -amilaze, glukoamilaze,  $\beta$ -amilaze, ali drugi enzimi mogu sudjelovati u razgradnji škroba kao npr. pululanaza (Ifuji i sur., 1996).

Amiloza je nerazgranati polisaharid građen od glukoznih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom i čini od 20 do 25 % škroba (Taniguchi i Honnda, 2009). Jedna molekula amiloze može biti građena od 25 do 1000 glukoznih jedinica, pa se njezina molekulska masa kreće između  $10^3$  -  $10^5$  g mol<sup>-1</sup> (Marić, 2000).

Amilopektin je znatno veća molekula od amiloze, razgranate je strukture i građen od glukoznih jedinica povezanih  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom u ravnom lancu, te  $\alpha$ -1,6-glikozidnom vezom na mjestima grananja lanaca. Ovaj polisaharid čini od 75 do 80 % škroba (Taniguchi i Honnda, 2009). Jedna molekula amilopektina građena je od oko 3000 glukoznih jedinica, a njezina molekulska masa prelazi  $5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  (Marić, 2000).

Škrobno zrnce kristalična je struktura, netopljiva u hladnoj vodi, nastala povezivanjem hidroksilnih skupina glukoznih podjedinica amiloze i amilopektina vodikovim vezama. Škrobno zrnce, osim amiloze, amilopektina i međustruktura, sadrži i manje količine lipida i fosfata (Burrell, 2003).

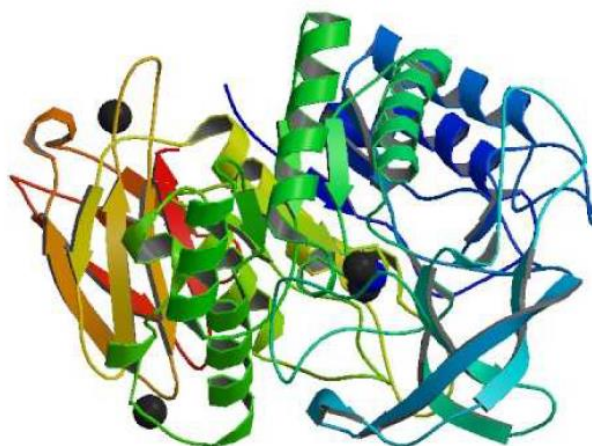
Hidrolizom škroba dobiva se smjesa glukoze, maltoze i dekstrina. Dekstrini su ugljikohidrati građeni od glukoznih podjedinica povezanih  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama (Sun i sur., 2010), a mogu se podijeliti na nisko-, srednje- i visokomolekulske dekstrine. Niskomolekulski dekstrini građeni su od tri do sedam glukoznih podjedinica i nazivamo ih maltodekstrinima. Dekstrine koji su građeni od osam do 12 glukoznih podjedinica zovemo ahrodekstrini. Visokomolekulski dekstrini imaju više od 12 glukoznih podjedinica (Marić, 2000).

### 2.1.2. $\alpha$ -amilaze

$\alpha$ -amilaze (1,4- $\alpha$ -D-glukan-4 glukanohidrolaze) široko je rasprostranjena grupa enzima koji kataliziraju hidrolizu  $\alpha$ -1,4 glikozidne veze u škrobnim sirovinama i topljivom škrobu stvarajući pri tome kraće dekstrine i oligosaharide (Rodriguez-Sanoja i sur., 2004).  $\alpha$ -amilaze pripadaju grupi endohidrolaza, što znači da mogu cijepati glikozidne veze u unutrašnjosti molekule škroba. U prvim fazama hidrolize proizvodi reakcije koju kataliziraju  $\alpha$ -amilaze su dekstrini visoke molekulske mase. Daljnjom hidrolizom stupanj polimerizacije supstrata se postupno smanjuje, te na kraju hidrolize kao produkt nastaje smjesa glukoze, maltoze i maltotrioze, te oligosaharida sa  $\alpha$ -1,6 vezama, koje ovaj enzim ne može hidrolizirati (Taniguchi i Honnda, 2009). Brzina reakcije hidrolize polimera, dekstrina i trioza, smanjuje se sa smanjenjem stupnja polimerizacije supstrata (Synowiecki, 2007).

Mikrobne  $\alpha$ -amilaze našle su primjenu u različitim granama industrije i njihova je primjena gotovo potpuno zamijenjena postupak kemijske hidrolize škroba. Ekstracelularnu  $\alpha$ -amilazu proizvodi širok spektar mikroorganizama, a izolirana je iz različitih vrsta, kao što su arheobakterije iz roda *Sulfolobus*, bakterije iz roda *Bacillus* (Slika 1.), te iz eukariotskih stanica, npr. iz plijesni iz roda *Aspergillus*. Prednost korištenja mikroorganizama za proizvodnju  $\alpha$ -

amilaze je ekonomičnost te jednostavan uzgoj mikroorganizama u cilju proizvodnje enzima. Termotabilnost i aktivnost u širokom rasponu pH vrijednosti dvije su najpoželjnije karakteristike za primjenu ove grupe amilaza. Većina  $\alpha$ -amilaza pokazuje optimalnu aktivnost pri temperaturama u rasponu od 30°C do 37°C i pri pH vrijednostima u neutralnom području, a izolirane su i  $\alpha$ -amilaze koje pokazuju aktivnost u jako kiselim (pH 3,0) ili lužnatim uvjetima (pH 10,0) i pri temperaturama višim od 100°C (Taniguchi i Honnda, 2009).



**Slika 1.** Struktura  $\alpha$ -amilaze (preuzeto iz Alikhajeh i sur., 2010).

## 2.2. Bakterije mliječne kiseline

Većina bakterija mliječne kiseline (BMK) su Gram-pozitivne, nesporogene bakterije koje se pojavljuju u obliku štapića ili koka, rijetko sintetiziraju enzim katalazu te ne mogu sintetizirati citokrome. Rastu na kompleksnim hranjivim podlogama pri mikroaerofilnim do anaerobnim uvjetima. Ova grupa bakterija ne može sintetizirati sve spojeve potrebne za rast i razmnožavanje te se zbog toga uzgajaju u hranjivim podlogama složenog sastava koje sadrže: aminokiseline, peptide, proteine, nukleotide, vitamine, mineralne tvari, masne kiseline i ugljikohidrate. BMK nemaju lanac za transport elektrona, a energiju za odvijanje različitih procesa u stanici pridobivaju fermentacijom (Axelsson, 2004). Osim nekoliko vrsta, ove su bakterije nepatogeni mikroorganizmi koji imaju GRAS (eng. Generally Recognised As Safe) status. BMK su okarakterizirane kao termofili, ali mogu rasti u temperaturnom rasponu od 5°C do 45°C. Optimalne pH vrijednosti za rast BMK kreću se u rasponu od 5,5 do 6,5, dok neki sojevi mogu rasti i pri nižim pH vrijednostima. Nakupljanjem proizvoda njihova metabolizma, prvenstveno mliječne kiseline, smanjuje se pH vrijednost hranjive podloge do vrijednosti od oko 4 pH

jedinice. U ovim uvjetima dolazi do inhibicije rasta i aktivnosti različitih mikroorganizama, koji su osjetljivi na niske pH vrijednosti u okolini.

U skupinu BMK pribraja se oko 20 rodova bakterija, od kojih su najznačajniji: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella*. Rod *Lactobacillus* je jedan od najbrojnijih rodova BMK. Vrste iz ovog roda BMK radni su mikroorganizmi koji se uglavnom koriste za biotehnološku proizvodnju mliječne kiseline, a prema načinu fermentacije izvora ugljika razlikujemo homofermentativne BMK i heterofermentativne BMK. Homofermentativne BMK su bakterije u čijim stanicama se odvija razgradnja ugljikohidrata do isključivo mliječne kiseline, dok heterofermentativne vrste proizvode mliječnu kiselinu, ali i neke druge spojeve kao krajnje produkte katabolizma, npr. etanol, acetoin, octenu kiselinu i ugljikov dioksid (John i sur., 2007).

### 2.2.1. Amilolitičke bakterije mliječne kiseline

Amilolitičke bakterije mliječne kiseline (ABMK) su grupa BMK koja može sintetizirati amilaze i zbog toga koristiti škrob kao jedini izvor ugljika i energije (Slavica i sur., 2015; Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011). ABMK mogu istovremeno provoditi hidrolizu škroba do jednostavnih ugljikohidrata (oligosaharida, maltoze i glukoze) i fermentaciju nastale maltoze i glukoze do mliječne kiseline.

Okarakterizirane su vrste ABMK koje mogu koristiti škrob kao jedini izvor ugljika i energije, kao što su npr. sojevi vrste *Lactobacillus amylovorus*.

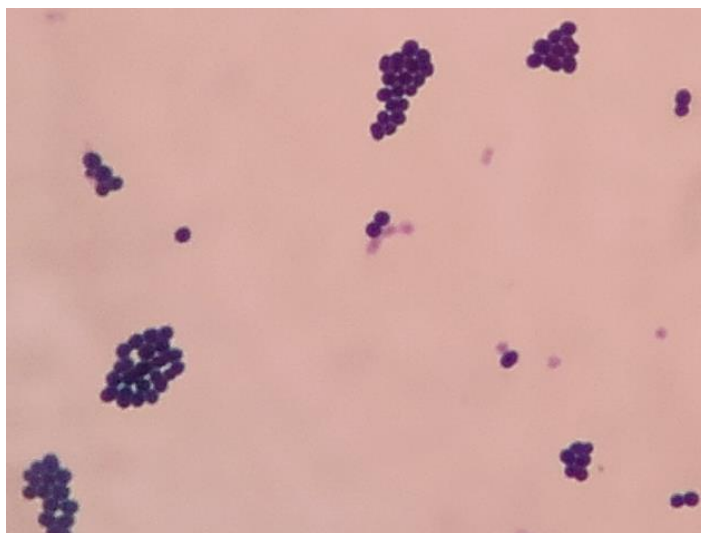
### 2.2.2. Amilolitička bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus amylovorus*

ABMK *Lactobacillus amylovorus* proizvodi ekstracelularnu amilazu i stoga može koristiti škrob i škrobne sirovine kao izvor ugljika i energije za proizvodnju mliječne kiseline, što je čini vrstom od interesa u industrijskoj proizvodnji mliječne kiseline iz škrobnih sirovina.

Pripada skupini obligatno homofermentativnih BMK, iako pri određenim uvjetima uz laktat proizvodi i acetat kao drugi krajnji proizvod razgradnje ugljikohidrata (Slavica i sur., 2015). Ova bakterija može proizvoditi oba stereoizomera mliječne kiseline, D- i L-laktat, u različitim omjerima. Omjer proizvedenih stereoizomera može se podešavati korištenjem

različitih izvora ugljika i podešavanjem temperature bioprocesa (Trontel i sur., 2010; Trontel i sur., 2011).

*L. amylovorus* (Slika 2.) može rasti na raznim di- i oligosaharidima te na polisaharidima, ali najbolji izvor ugljika za njegov rast i proizvodnju mliječne kiseline su jednostavni ugljikohidrati, kao što je glukoza. Okarakterizirana je smanjena proizvodnja  $\alpha$ -amilaze u odsustvu glukoze, u usporedbi s proizvodnjom ovog aktivnog enzima u prisutstvu glukoze.



**Slika 2.** Mikroskopska slika soja *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>. Stanice su fiksirane na površini predmetnice i obojene po Gramu. Priređeni je preparat promatran pod imerzijskim objektivom svjetlosnog mikroskopa Olympus CX21FS1 (Olympus; Tokyo, Japan) pri povećanju od tisuću puta.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Mikroorganizam

U ovom diplomskom radu kao radni mikroorganizam korištena je amilolitička bakterija mliječne kiseline (ABMK) *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> (ATCC 33620, NRRL B-4540). Ovaj soj nabavljen je iz zbirke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Njemačka) i čuva se u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

##### 3.1.2.1. Kemikalije za pripremu hranjive MRS-mal<sub>20</sub> podloge za uzgoj ABMK i proizvodnju $\alpha$ -amilaze

**Tablica 1.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu hranjive MRS-mal<sub>20</sub> podloge za uzgoj ABMK i proizvodnju  $\alpha$ -amilaze.

kemikalija	kemijska formula	čistoća	proizvođač
diamonijev citrat	$\text{HOC}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4)_2$	p.a.	Merck, Njemačka
dikalijev fosfat	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	tehnički	Biolife, Italija
kvašćev ekstrakt	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat	$\text{MgSO}_4$	p.a.	Merck, Njemačka
maltoza monohidrat	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Kemika, Hrvatska

**Tablica 1.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripravu hranjive MRS-mal<sub>20</sub> podloge za uzgoj ABMK i proizvodnju  $\alpha$ -amilaze (nastavak).

manganov sulfat monohidrat	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	p.a.	Merck, Njemačka
mesni ekstrakt	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
natrijev acetat trihidrat	CH <sub>3</sub> COONa · 3 H <sub>2</sub> O	p.a.	Merck, Njemačka
Pepton	-	za upotrebu u biotehnologiji	Merck, Njemačka
polisorbat 80 (Tween 80®)	C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub>	p.a.	Merck, Njemačka

### 3.1.2.2. Kemikalije za pripravu otopina za ion-izmjenjivačku kromatografiju

**Tablica 2.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripravu otopina za ion-izmjenjivačku kromatografiju.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
natrijev acetat	CH <sub>3</sub> COONa	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid	NaCl	p.a.	Kemika, Hrvatska
octena kiselina	CH <sub>3</sub> COOH	p.a.	Kemika, Hrvatska

### 3.1.2.3. Kemikalije za pripremu otopina za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (eng. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) i detekciju proteina u gelu

**Tablica 3.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripremu otopina za SDS-PAGE i detekciju proteina u gelu.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
boja brom-fenol plavo	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	za elektroforezu	Sigma-Aldrich, SAD
Akrlamid	$CH_2=CHCONH_2$	$\geq 99\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich, SAD
amonijev persulfat (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	min. 99 %	SERVA, Njemačka
boja Coomassie Brilliant Blue R-250, za elektroforezu	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	(udio boje oko 90%)	Sigma-Aldrich, SAD
etanol	$CH_3CH_2OH$	96 %	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	$(HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
formaldehid	$HCOH$	p.a.	Kemika, Hrvatska
glicerol	$HOCH_2CH(OH)CH_2OH$	p.a.	Kemika, Hrvatska
glicin	$NH_2CH_2COOH$	p.a.	Kemika, Hrvatska
izopropanol	$(CH_3)_2CHOH$	p.a.	CLARO-PROM d.o.o., Hrvatska
klorovodična kiselina	$HCl$	p.a.	Kemika, Hrvatska
metanol	$CH_3OH$	p.a.	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiltilendiamin (TEMED)	$(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$	98 %	LKB Produkter AB, Bromma, Švedska
natrijev dodecilsulfat (SDS)	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	$\geq 98.5\%$ (GC)	Sigma-Aldrich, SAD
natrijev karbonat	$Na_2CO_3$	p.a.	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska

**Tablica 3.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripravu otopina za SDS-PAGE i detekciju proteina u gelu (nastavak).

natrijev tiosulfat pentahidrat	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
obilježavači masa za denaturirajuću elektroforezu (niskomolekulski proteinski standard ili LMW standard)	-	-	Amersham, Biosciences, SAD
octena kiselina	$\text{CH}_3\text{COOH}$	99 - 100 %	Kemika, Hrvatska
srebrov nitrat	$\text{AgNO}_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
tris(hidroksimetil)aminometan(Tris)	$(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
2-merkaptetanol	$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	za elektroforezu	Sigma-Aldrich, SAD

#### 3.1.2.4. Kemikalije za pripravu otopina za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

**Tablica 4.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripravu otopina za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
cinkov sulfat pentahidrat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Merck, Njemačka
fosforna kiselina	$\text{H}_3\text{PO}_4$	p.a. za HPLC	Fluka, Njemačka

### 3.1.2.5. Kemikalije za pripravu otopina za određivanje koncentracije proteina i aktivnosti enzima

**Tablica 5.** Čistoća i porijeklo kemikalija za pripravu otopina za određivanje koncentracije proteina i aktivnosti enzima.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
BSA	-	p.a	Santa Cruz Biotechnology Inc., SAD
Folin – Ciocalteu reagens	$C_{10}H_5NaO_5S$	-	Merck, Njemačka
natrijev karbonat	$Na_2CO_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev hidroksid	$NaOH$	p.a.	Kemika, Hrvatska
bakrov sulfat	$CuSO_4$	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev natrij tartarat	$KNaC_4H_4O_6$	p.a.	Kemika, Hrvatska
škrob	$C_6H_{10}O_5$	p.a.	Kemika, Hrvatska
jod	$I_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
octena kiselina	$CH_3COOH$	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev acetat	$CH_3COONa$	p.a.	Kemika, Hrvatska

### 3.1.2.6. Kemikalije za taloženje proteina

**Tablica 6.** Čistoća i porijeklo kemikalija za taloženje proteina.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
amonijev sulfat	$(NH_4)_2SO_4$	p.a.	Kemika, Hrvatska

### 3.1.2.7. Kemikalije za određivanje koncentracije reducirajućih spojeva RS metodom

**Tablica 7.** Čistoća i porijeklo kemikalija za određivanje koncentracije reducirajućih spojeva RS metodom.

kemikalije	kemijska formula	čistoća	proizvođač
bakrov sulfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalij natrij tartarat	$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev jodid	KI	p.a.	Kemika, Hrvatska
sumporna kiselina	$\text{H}_2\text{SO}_4$	p.a.	Kemika, Hrvatska
škrob	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev tiosulfat	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska

### 3.1.2.8. Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterijskog soja

Za čuvanje ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> korištena je tekuća hranjiva De Man, Rogosa i Sharpe (MRS) podloga (MRS-glc<sub>20</sub> podloga; De Man i sur., 1960). Za uzgoj ovog bakterijskog soja u epruветama, Erlenmeyer tikvicama i u bioreктору s miješalom te za indukciju sinteze amilaze korištena je modificirana MRS hranjiva podloga u kojoj je glukoza ( $\gamma_{s_0} = 20,0 \text{ g L}^{-1}$ ) zamijenjena disaharidom maltozom ( $\gamma_{s_0} = 20,0 \text{ g L}^{-1}$ ; MRS-mal<sub>20</sub> podloga), a koncentracija preostalih sastojaka podloge nije mijenjana.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### 3.1.3.1. Laboratorijski bioreaktor s miješalom

Za uzgoj ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi i indukciju sinteze amilaze korišten je laboratorijski bioreaktor s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Germany; Slika 3.), kao što je to već prije opisano u detalje (Kostelac, 2016).



**Slika 3.** Laboratorijski bioreaktor s miješalom i mjerno-kontrolnom digitalnom jedinicom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Goettingen, Germany).

#### 3.1.3.2. Centrifuge

Prilikom izrade ovog diplomskog rada korištene su tri centrifuge: centrifuga Thermo Scientific SL8R (Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Danska), centrifuga Harrier 18/80 (Sanyo, Warford, Velika Britanija) i centrifuga Beckman J-21B (Beckman Coulter, Krefeld, Njemačka).



Centrifuga Thermo Scientific SL8R korištena je za odjeljivanje supernatanta od bakterijske biomase i to u polipropilenskim kivetama (50 mL) (Nalgene, Nalge Nunc International, USA), kao i za koncentriranje supernatanta uzoraka prije izdvajanje amilaze ion-izmjenjivačkom kromatografijom. Uzorci su koncentrirani u polipropilenskim kivetama s membranom (Amicon® Ultra-15; Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, SAD). Pomoću ove membrane odijeljene su i koncentrirane molekule s molekulskom masom većom od  $10,000 \pm 5,000$  Da (eng. Molecular Weight Cut Off, MWCO,  $10 \pm 5$  kDa).

Centrifuga Harrier 18/80 korištena je za odjeljivanje biomase od supernatanta i to za određivanja suhe tvari biomase te za odjeljivanje istaloženih proteina cinkovim sulfatom iz supernatanta prilikom pripreme uzoraka za analizu HPLC metodom.

Centifuga Beckman J-21B korištena je za izdvajanje većih volumena supernatanta u polipropilenskim kivetama (500 mL) tijekom uzgoja.

### **3.1.3.3. Spektrofotometri**

Optička gustoća uzoraka izdvojenih tijekom šaržnog uzgoja ABMK u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom i njihovih decimalnih razrjeđenja ( $10^{-1}$  i  $10^{-2}$ ) određena je pomoću spektrofotometra Cary 13E Varian (Varian, Mulgrave, Australija). Izuzete suspenzije su homogenizirane i prebačene u staklene kivete promjera 10 mm (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka). Njihova optička gustoća određena je pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 600 nm ( $A_{600}$ ).

Apsorbancija uzoraka tijekom određivanja koncentracije proteina određena je pomoću spektrofotometra UviLine 9400 (SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka) pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 740 nm ( $A_{740}$ ). Pomoću ovog spektrofotomera praćeno je opadanje apsorbancije uzoraka priređenih za određivanje aktivnosti amilaze pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 610 nm ( $A_{610}$ ).

### **3.1.3.4. Sustav za ion-izmjenjivačku kromatografiju**

Za izdvajanje amilaze korišten je kromatografski sustav Pharmacia Biotech P-900 (RediFrac Pharmacia, Uppsala, Švedska) te ion-izmjenjivačka kolona (Mono Q™ 4.6/100 PE, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska). Sustav se sastoji od boca za pokretne faze, injektora, pumpi, kolone, UV-Vis detektora i sakupljača frakcija.

### **3.1.3.5. Sustav za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)**

Sustav za SDS-PAGE (Slika 4.) sastoji se od izvora električne energije (Electrophoresis Power Supply EPS; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Švedska) i sustava za vertikalnu gel elektroforezu (SIGMA ALDRICH CVS10CBS omniPAGE mini dual; Sigma Aldrich, Milwaukee, SAD; Slika 4.). Za nanošenje uzoraka i proteinskih standarda (eng. Low Molecular Weight standard, LMW standard; Amersham Biosciences, Uppsala, Švedska), u jažice gela, korištena je mikropipeta volumena 15 µL (Scientific Glass Engineering Pty Ltd., Melbourne, Australija).



**Slika 4.** Sustav za vertikalnu gel elektroforezu SIGMA ALDRICH CVS10CBS omniPAGE mini dual (Sigma Aldrich, Milwaukee, SAD).

### **3.1.3.6. Oprema za filtraciju pokretne faze za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti i ultrazvučna kupelj**

Kao mobilna faza za analizu uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) korištena je otopina  $H_3PO_4$  (0,1 % vol/vol). Otopina je profiltrirana kroz najlonski filter (0,22  $\mu m$ , 47 mm; Magna, GE Water & Process Technologies, Trevose, SAD) pomoću boce za filtriranje (Nalgene, Rochester, New York, SAD) te nakon toga degazirana u ultrazvučnoj kupelji USC300T (VWR International, Leuven, Belgija) kroz 20 minuta.

### **3.1.3.7. Sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti**

Koncentracije supstrata (maltoze) kao i krajnjeg proizvoda metabolizma (mliječne kiseline) u supernatantu izuzetih uzoraka određene su pomoću kromatografa Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan; Slika 5.). Opis sustava i postupak određivanja koncentracije opisani su u diplomskom radu Kostelac (2016).



**Slika 5.** Kromatograf Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu; Kyoto, Japan). 1 - boca za pokretnu fazu; 2 - otplinjač; 3 - podjedinica za formiranje gradijenta; 4 - pumpa; 5 - auto-injektor; 6 - pećnica s predkolonom i kolonom; 7 - detektor.

### **3.1.3.8. Ostala oprema**

- analitička vaga Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan);
- tehnička vaga Tehtnica (Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija);
- autoklav Sutjeska;
- mikser EV-100, Tehtnica (Železniki d.o.o., Železniki, Slovenija);
- sušionik Instrumentarija ST-50 (Instrumentarija, Zagreb, Hrvatska);
- Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Latvija);
- magnetsko miješalo VMS-C4 (VWR International, Leuven, Belgija);
- bakteriološki elektronski termostatski aparat BTE-S (Termomedicinski aparati, Zagreb, Hrvatska);
- staklena sisaljka na vodeni mlaz s gumenim vakuum crijevom (Hospitalija; Zagreb, Hrvatska);
- osobno računalo s operativnim sustavom MS Windows Vista Professional i programskim paketom MS Office 2010.

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Priprava hranjivih podloga**

Za čuvanje, održavanje i uzgoj ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u staklenim epruvetama ( $V_K = 10$  mL) korištena je tekuća MRS-glc<sub>20</sub> podloga te MRS-mal<sub>20</sub> podloga, koja je ujedno korištena za uzgoj bakterije u Erlenmeyer tikvicama ( $V_K = 250$  ml) i u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom ( $V_K = 10,0$  L). Za pripremu MRS-mal<sub>20</sub> podloge korišteni su sastojci čiji je sastav naveden u Tablici 1. Sastojci su odvagani i otopljeni u demineraliziranoj vodi. Pripremljena podloga sterilizirana je u epruvetama i Erlenmeyer tikvicama u autoklavu pri 121°C tijekom 20 minuta te prije uzgoja u bioreaktoru *in situ* pri 121°C kroz 20 minuta.

### **3.2.2. Priprava cjepiva za uzgoj ABMK u tikvici i laboratorijskom bioreaktoru s miješalom**

ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> (0,1 mL suspenzije) naciepljena je iz tekuće MRS-mal<sub>20</sub> podloge u po dvije staklene epruvete sa 10 mL ove sterilne podloge. Soj je istim postupkom uzastopno precjepljivan. S ovako uzgojenom kulturom (6-7 mL) naciepljena je MRS-mal<sub>20</sub> podloga (250 mL) u Erlenmeyer tikvici (500 mL), koja je zatim inkubirana kroz 48 h bez stresanja pri 37°C. Nakon uzgoja u MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u Erlenmeyer tikvici, cijeli sadržaj tikvice (250 mL) prepumpen je pomoću peristaltičke pumpe (CH-8604; Chemap AG, Mannedorf, Švicarska) u laboratorijski bioreaktor s prethodno steriliziranom i ohlađenom MRS-mal<sub>20</sub> podlogom ( $\approx 40^{\circ}\text{C}$ ,  $V_K = 10,0\text{ L}$ ).

### **3.2.3. Uzgoj bakterije i indukcija sinteze amilaze u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom**

ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> uzgojena je u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom Biostat Cplus (Sartorius BBI Systems GmbH, Goettingen, Germany) šaržnim postupkom u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi ( $V_K = 10,0\text{ L}$ ). Podloga je sterilizirana vodenom parom ( $121^{\circ}\text{C}/20\text{ min}$  uz miješanje,  $n = 400\text{ min}^{-1}$ ), a zatim je ohlađena ( $\approx 40^{\circ}\text{C}$ ) i sterilna hranjiva podloga je naciepljena s 250 mL prekonoćne bakterijske kulture s pomoću peristaltičke pumpe (CH-8604; Chemap AG, Mannedorf, Švicarska). Tijekom uzgoja temperatura hranjive podloge održavana je pri  $40 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , te je miješana ( $n = 400\text{ min}^{-1}$ ) da bi se održala homogenost suspenzije. Na početku uzgoja pH vrijednost hranjive podloge bila je  $5,96 \pm 0,2$ . Zbog proizvodnje mliječne kiseline pH vrijednost je opala, a kada se smanjila do  $5,5 \pm 0,2$ , započelo je automatsko doziranje otopine NaOH ( $c = 5,0\text{ mol L}^{-1}$ ). Tijekom cijelog uzgoja pH vrijednost se održavala pri vrijednosti od  $5,5 \pm 0,2$ . Uzorci su izuzimani svakih sat vremena tijekom prvih 9,0 h uzgoja, a nakon izuzimanja uzoraka određena je njihova optička gustoća ( $A_{600}$ ) i uzgoj je zaustavljen kada je, sukladno vrijednostima za  $A_{600}$ , utvrđeno da je rast ABMK ušao u stacionarnu fazu rasta. Nakon  $t = 8,0$  i  $25,0\text{ h}$  uzgoja izuzeto je, redom, oko 3,0 L i 5,0 L bakterijske suspenzije. Iz ovih uzoraka izdvojena je bakterijska biomasa i supernatanti su spremljeni pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.4. Izdvajanje amilaze**

#### **3.2.4.1. Priprema uzoraka za izdvajanje amilaze i taloženje amonijevim sulfatom**

Volumen od 1,5 L supernatanta izuzetog nakon  $t = 8,0$  sati podijeljen je na tri jednaka dijela ( $V \approx 500$  mL). U svaki dio dodana je različita, prethodno određena, masa amonijevog sulfata kako bi došlo do taloženja proteina pri različitim koncentracijama zasićenja otopine amonijevim sulfatom. Proteini su taloženi pri 25, 50 i 75% zasićenja. Taloženje se provodilo postupnim dodavanjem soli uz miješanje na magnetskom miješalu pri  $\theta = 4^{\circ}\text{C}$ . Centrifugiranjem (centrifuga Beckman J-21B; 20 min/ $4^{\circ}\text{C}$ /5000 rpm) su izdvojeni istaloženi protein i resuspendirani u Na-acetatnom puferu, 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5. Ove otopine prebačene su u polipropilenske kivete s membranom (MWCO  $10 \pm 5$  kDa; Amicon® Ultra-15; Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, SAD, SAD) te su odsoljene i koncentrirane (centrifuga Thermo Scientific SL8R; 20 min/ $4^{\circ}\text{C}$ /3000 rpm). U koncentratima je određena koncentracija proteina metodom po Lowry-u i aktivnost enzima. Koncentrat je spremljen pri  $4^{\circ}\text{C}$  za izdvajanje amilaze ion-izmjenjivačkom kromatografijom.

#### **3.2.4.2. Ion-izmjenjivačka kromatografija**

Za izdvajanje amilaze ion-izmjenjivačkom kromatografijom korištena je metoda gradijentne elucije, odnosno sastav eluensa mijenjao se linearno (od 0 do 1 mol L<sup>-1</sup> NaCl) tijekom kromatografskog odjeljivanja. Kao eluens korištena je smjesa Na-acetatnog 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5 pufera i 1,0 mol L<sup>-1</sup> NaCl u tom puferu.

### **3.2.5. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)**

Postupak i princip razdvajanja proteina iz smjese elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijevog dodecilsulfata opisan je u detalje u diplomskom radu Kostelac (2016).

### **3.2.6. Analitičke metode**

Tijekom šaržnoj uzgoja ABMK *L. amylovorus* DMS 20531<sup>T</sup> u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom izuzimani su uzorci te je praćena optička gustoća suspenzije ( $A_{600}$ ) kao i decimalnih razrijeđenja ove suspenzije ( $10^{-1}$  i  $10^{-2}$ ) i to kako bi definirali kinetiku rasta bakterijske kulture. Određivana je koncentracija maltoze ( $\gamma_S$ ) i mliječne kiseline ( $\gamma_P$ ) HPLC metodom kako bi okarakterizirali dinamiku potrošnje maltoze i proizvodnje mliječne kiseline. Centrifugiranjem je izdvojena biomasa i koncentracija suhe tvari biomase ( $\gamma_X$ ) određena je gravimetrijskom metodom. Tijekom dvostupanjske izolacije amilaze u uzorcima je određena koncentracija proteina metodom po Lowry-u i aktivnost enzima.

#### **3.2.6.1. Određivanje optičke gustoće uzoraka izuzetih tijekom šaržnog uzgoja ABMK**

Vrijednosti za  $A_{600}$  suspenzije i njezinog prvog i drugog razrijeđenja određene su pomoću UV/Vis spektrofotometra (Cary 13E Varian) pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 600 nm. Prvo razrijeđenje pripremljeno je na način da se u epruvetu sa 9,0 mL sterilne vode otpipetira 1,0 mL izuzete suspenzije i homogenizira. Iz ovog razrijeđenja ( $10^{-1}$ ) opisanim postupkom pripravlja se drugo razrijeđenje ( $10^{-2}$ ). Oko 3,5 do 4,0 mL suspenzije ili odgovarajućeg razrijeđenja prenese se u kivetu i očita apsorbancija.

### **3.2.6.2. Određivanje suhe tvari biomase u uzorcima izuzetima tijekom šaržnog uzgoja ABMK**

Suspenzija izuzeta tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DMS 20531<sup>T</sup> u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom prenesena je u prethodno osušene i izvagane kivete ( $V = 7$  mL). Suspenzija je zatim centrifugirana, supernatant je otpipetiran iz kivete, a bakterijska biomasa u kivetu sušena je pri 100°C do postizanja konstantne mase. Kivete s osušenom biomasom ohlađene su na sobnu temperaturu i izvagane na analitičkoj vagi Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan).

### **3.2.6.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

#### **3.2.6.3.1. Taloženje proteina cinkovim sulfatom**

Prije analize uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti proteine iz supernatanta potrebno je istaložiti cinkovim sulfatom kako bi se spriječilo opterećenje predkolone i kolone. Postupak taloženja detaljno je opisan u diplomskom radu Kostelac (2016).

#### **3.2.6.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

Kromatografski sustav korišten u ovom radu (Shimadzu CLASS-VP LC-10A<sub>VP</sub>; Shimadzu, Kyoto, Japan) sastojao se od: crpke (LC-10AD<sub>VP</sub>), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10AD<sub>VP</sub>), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A<sub>VP</sub>), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel<sup>TM</sup> C-610H; 30 cm x 7.8 mm ID, 9 µm) sa predkolonom (Supercogel<sup>TM</sup> H; 5 cm X 4.6 mm ID, 9 µm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10A<sub>VP</sub>) i računalnog programa (CLASS-VP v6.10). Za analizu uzoraka u kojima je praćena dinamika potrošnje maltoze iz MRS-mal<sub>20</sub> podloge i dinamika proizvodnje mliječne kiseline, korištena je optimirana kromatografska metoda (Slavica i sur., 2015), a procjena rezultata kromatografske analize napravljena je pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10 i pripadajućih vrijednosti očitanih iz baždarnih pravaca (Batušić, 2008).



### 3.2.6.4. Određivanje koncentracije reducirajućih spojeva RS metodom

#### Postupak

Približno 30 mL suspenzije se centrifugira (20 min/4°C/9000 rpm) od čega se 10 mL supernatanta uzima za analizu. Supernatant se otpipetira u tikvicu s okruglim dnom, te se doda 15 mL destilirane vode. Uzorku u tikvici doda se 10 mL otopine A (69,3 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O; Fehling I) i 10 mL otopine B (346 g L<sup>-1</sup> KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub>; Fehling II), smjesa se zagrijava i kuha točno dvije minute uz povratno hladilo. Ohlađenoj smjesi dodaje se 10 mL otopine C (30%-tna otopina KI) i 10 mL otopine D (26%-tna otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Nakon što se dobro izmješa, ovoj se smjesi doda 2 mL otopine škroba (1%-tna otopina škroba u 0,9%-tnom NaCl) te se titrira s otopinom Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (*c* = 0,1 mol L<sup>-1</sup>) do prelaza tamnoplave boje u ružičasto-bež boju, koja se treba zadržati jednu minutu. Isti postupak provodi se s otopinom glukoze (glukoza test) i vodom (slijepa proba). Za glukoza test (kontrola) uzima se 5 mL otopine glukoze (1%-tna otopina) i 20 mL vode, a za slijepu probu 25 mL destilirane vode. Koncentracija reducirajućih spojeva izračuna se prema donjem izrazu:

$$\gamma_{RS} = (50 \times (a-b)) / ((a-c) \times d) \quad (\text{g L}^{-1}) \quad [1.]$$

gdje je:

$\gamma_{RS}$  - koncentracija reducirajućih spojeva (g L<sup>-1</sup>),

a - volumen otopine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>) utrošen za titraciju slijepa probe (mL),

b - volumen otopine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>) utrošen za titraciju uzorka (mL),

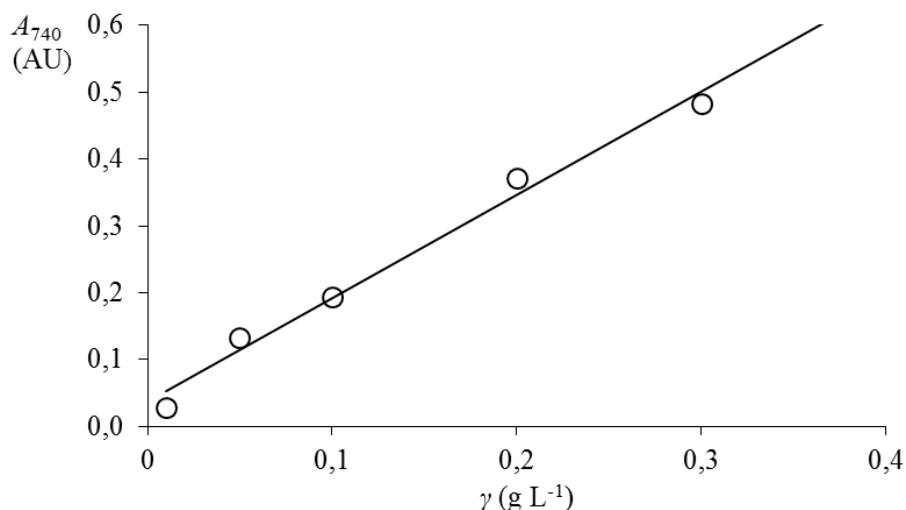
c - volumen otopine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,1 mol L<sup>-1</sup>) utrošen za titraciju glukoza testa (mL),

d - volumen uzorka (supernatanta) uzet za analizu.

### 3.2.6.5. Određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u

Za određivanje koncentracije proteina metodom po Lowry-u, izrađen je baždarni pravac ovisnosti apsorpcije uzoraka o koncentraciji albumina seruma goveda i to pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 740 nm (spektrofotometar UviLine 9400, SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka) (Slika 6.).

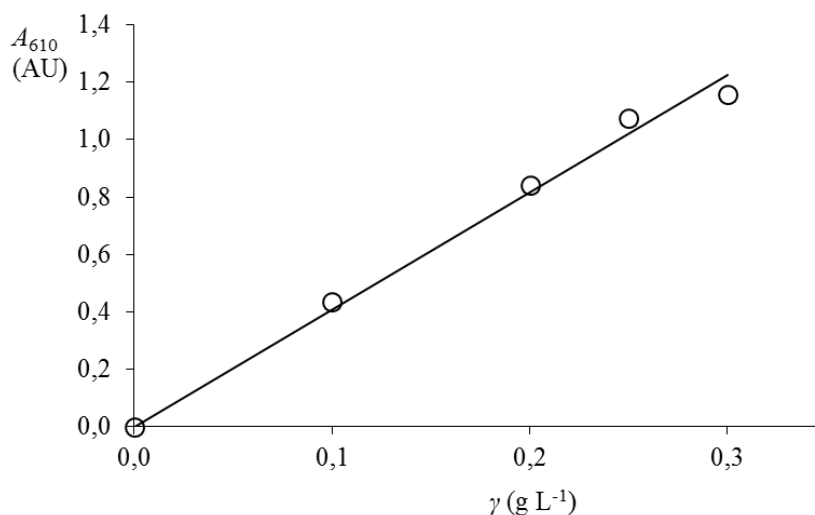
Za određivanje koncentracije proteina u zorcima, u 0,4 mL uzorka dodano je 2 mL reagensa C [50 mL otopine A (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  NaOH i 1 mL reagensa B (0,5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  u 1% K,Na-tartaratu)], dobivena suspenzija je promiješana i ostavljena pri sobnoj temperaturi kroz 10-15 minuta. Nakon toga u ovu je smjesu naglo dodano 0,2 ml razrijeđenog (1 volumen reagens + 2 volumena demineralizirane vode) Folin-Ciocalteu reagensa (Merck, Darmstadt, Njemačka) uz snažno miješanje i tako priređena smjesa ostavljena je pri sobnoj temperaturi kroz 40-60 minuta. Nakon toga, izmjerene su apsorbancije uzoraka ( $A_{740}$ ).



**Slika 6.** Baždarni dijagram ovisnosti koncentracije albumina seruma goveda o apsorbanciji ( $A_{740}$ ).

### 3.2.6.6. Određivanje aktivnosti enzima

Prije određivanja aktivnosti enzima u uzorcima, izrađen je baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije pri valnoj duljini svjetlosti ( $\lambda$ ) od 610 nm ( $A_{610}$ ) o koncentraciji škroba u Na-acetatnom puferu, 50 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 5,5 (Slika 7.). Aktivnost enzima određena je pri 55°C u različitim uzorcima i to u otopini škroba u puferu nakon dodatka uzorka (enzimske otopine). Aktivnost je izračunata iz linearnog nagiba pravca, koji pokazuje opadanje intenziteta obojenja kompleksa škrob - jod u reakcijskoj smjesi i to kroz određeni vremenski period pri odabranim uvjetima.



**Slika 7.** Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije ( $A_{610}$ ) o koncentraciji škroba u Na-acetatnom puferu (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 5,5).

### 3.2.7. Analiza eksperimentalnih podataka - izračunavanje pokazatelja uspješnosti rasta i proizvodnje mliječne kiseline ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>

Pomoću nelinearnog modela i linearizacije eksperimentalnih vrijednosti za suhu tvar biomase ( $\gamma_X$ ), koncentraciju supstrata ( $\gamma_S$ ) i koncentraciju proizvedene mliječne kiseline ( $\gamma_P$ ) izračunate su maksimalna specifična brzina rasta ( $\mu$ ), brzina potrošnje supstrata ( $q_S$ ) i brzina proizvodnje mliječne kiseline ( $q_P$ ) u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi.

$$\ln \gamma_{X(\max)} = \ln \gamma_{X0} + \mu_{(m)} \cdot t \quad [2.]$$

$$\ln \gamma_S = \ln \gamma_{S0} + q_S \cdot t \quad [3.]$$

$$\ln \gamma_P = \ln \gamma_{P0} + q_P \cdot t \quad [4.]$$

gdje je:

$\gamma_{X(\max)}$  (maksimalna) koncentracija suhe tvari biomase [g L<sup>-1</sup>],

$\gamma_{X0}$  koncentracija suhe tvari biomase na početku uzgoja [g L<sup>-1</sup>],

$\mu_{(m)}$	(maksimalna) specifična brzina rasta bakterije [ $\text{h}^{-1}$ ],
$t$	vrijeme proteklo od početka uzgoja [h],
$\gamma_S$	koncentracija supstrata u vremenu $t$ [ $\text{g L}^{-1}$ ],
$\gamma_{S0}$	koncentracija supstrata na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ],
$q_S$	brzina potrošnje supstrata [ $\text{h}^{-1}$ ],
$\gamma_P$	koncentracija proizvedene mliječne kiseline u vremenu $t$ [ $\text{g L}^{-1}$ ],
$\gamma_{P0}$	koncentracija mliječne kiseline na početku uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ],
$q_P$	brzina proizvodnje mliječne kiseline [ $\text{h}^{-1}$ ],

Koeficijent  $Y_{X/S}$  predstavlja masu prirasle biomase po jedinici mase utošenog supstrata, a izračunava se prema slijedećoj jednadžbi:

$$Y_{P/S} = \frac{\gamma_P - \gamma_{P_0}}{\gamma_{S_0} - \gamma_S} [\text{g g}^{-1}] \quad [5.]$$

Koeficijent  $Y_{P/S}$  predstavlja masu proizvedene mliječne kiseline po jedinici mase utrošenog supstrata, a izračunava se prema slijedećoj jednadžbi:

$$Pr_X = \frac{\gamma_X - \gamma_{X_0}}{t} [\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}] \quad [6.]$$

Produktivnost uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> ( $Pr_X$ ) te produktivnost proizvodnje mliječne kiseline ( $Pr_P$ ) tijekom rasta ove ABMK izračunata je prema ovoj jednadžbi:

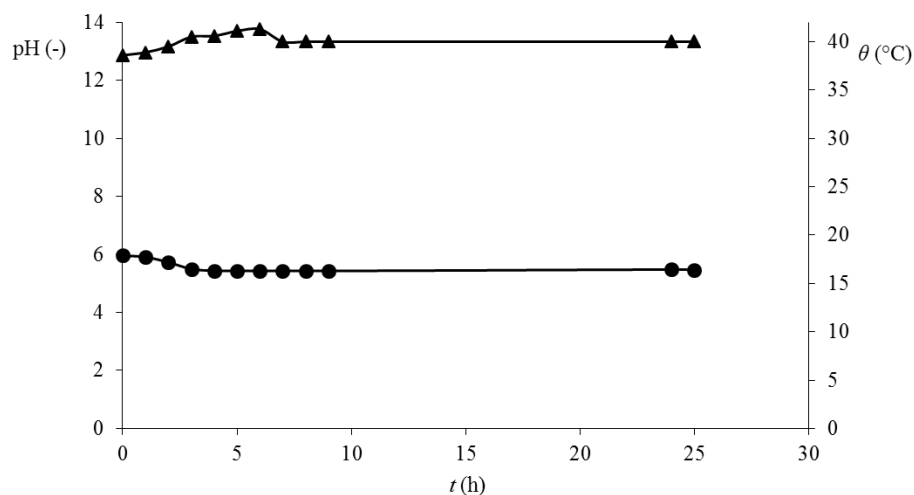
$$Pr_P = \frac{\gamma_P - \gamma_{P_0}}{t} [\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}] \quad [7.]$$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Uzgoj ABMK *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom

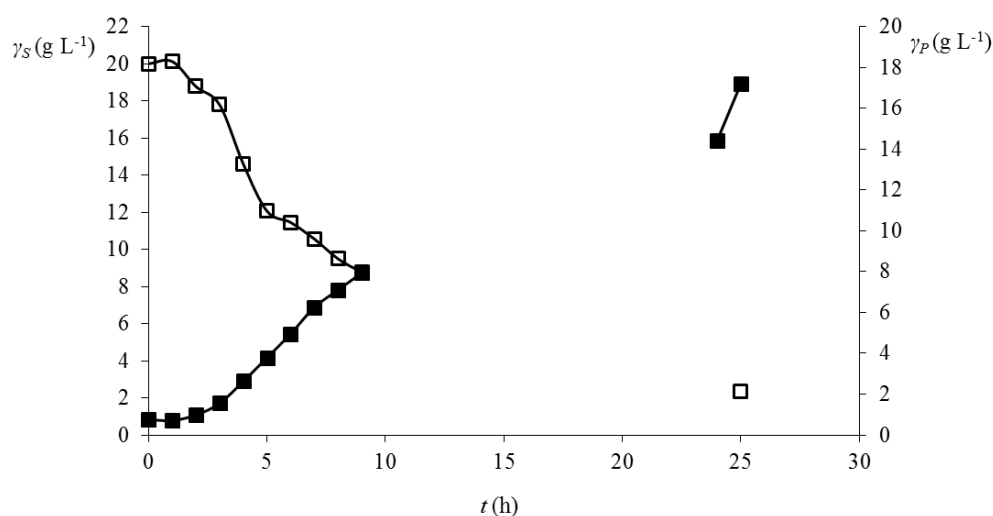
Ovaj rad je nastavak prethodnih istraživanja u ovoj istraživačkoj grupi i plan eksperimenata je načinjen sukladno prethodnom radu (Kostelac, 2016). U prethodnom radu sinteza amilaze ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> inducirana je maltozom i proizvedeni enzim je izdvojen afinitetnom kromatografijom. Izdvojena su ukupno tri proteinska pika koja su imala aktivnost prema škrobu i hidrolizirala ovaj polimerni ugljikohidrat do maltoze i drugih maloooligosaharida, kako je to utvrđeno HPLC metodom.

U ovom radu indukcija amilaze također je provedena maltozom i to pri odabranim uvjetima uzgoja soja ABMK u laboratorijskom mjerilu, kako je to pokazano na Slici 8.

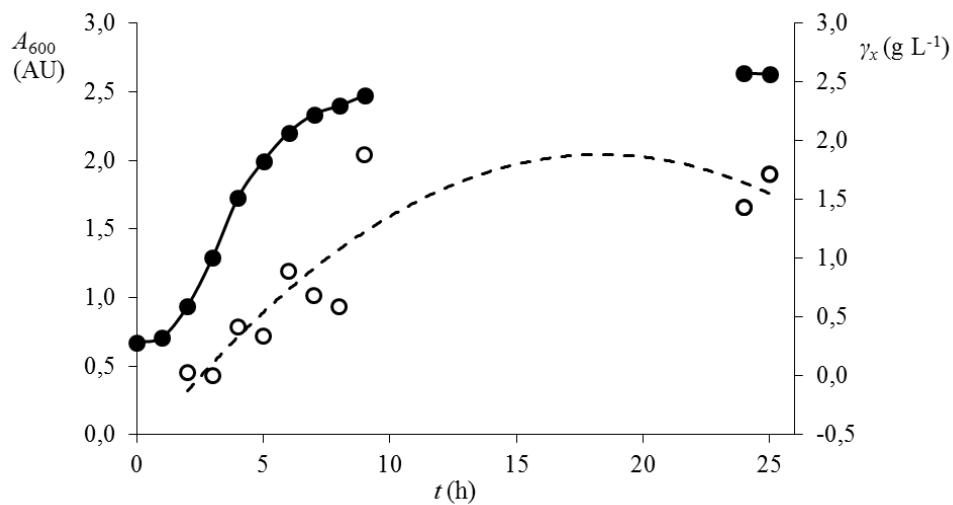


**Slika 8.** Promjena pH vrijednosti (●) i temperature ( $\theta$ , ▲) tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

Pri odabranim uvjetima ABMK može koristiti maltozu kao jedini izvor ugljika i energije i proizvoditi mliječnu kiselinu (Slika 9.). Porast bakterijske biomase tijekom uzgoja *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> prikazan je na slici 10. Iz eksperimentalnih vrijednosti izračunati su biokinetički parametri rasta ovog soja (Tablica 8.) kao i parametri proizvodnje mliječne kiseline s pomoću ove ABMK u opisanim uvjetima (Tablica 9.).



**Slika 9.** Promjena koncentracije maltoze ( $\gamma_s$ , □) i koncentracije mliječne kiseline ( $\gamma_p$ , ■) tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.



**Slika 10.** Promjena optičke gustoće suspenzije ( $A_{600}$ , ●) i koncentracije suhe tvari bakterijske biomase ( $\gamma_x$ , ○) tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.



**Tablica 8.** Trajanje faza rasta ( $t_{\text{FAZE RASTA}}$ ; lag faza, lag; eksponencijalna faza, eksp) i vrijednosti za specifičnu brzinu rasta bakterije ( $\mu$ ), maksimalnu koncentraciju biomase ( $\gamma_{X_{\text{max}}}$ ), brzinu konverzije supstrata ( $q_s$ ), koeficijent konverzije supstrata u bakterijsku biomasu ( $Y_{X/S}$ ) i produktivnost sinteze bakterijske biomase ( $Pr_X$ ) procijenjene na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

rast ABMK <i>L. amylovorus</i> DSM 20531 <sup>T</sup>						
$t_{\text{FAZE RASTA}}$ (h)		$\mu$	$\gamma_{X_{\text{max}}}$	$q_s$	$Y_{X/S}$	$Pr_X$
lag	eksp	(h <sup>-1</sup> )	(g <sub>X</sub> L <sup>-1</sup> )	(h <sup>-1</sup> )	(g <sub>X</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )	(g <sub>X</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1,0	5,0	0,51	2,64	0,05	0,12	0,06

Podaci koji opisuju fiziologiju ABMK iz roda *Lactobacillus* tijekom rasta na maltozi nisu dostupni u objavljenim istraživanjima ili bazama podataka. Ovdje procijenjeni biokinetički parametri, dobiveni na temelju eksperimentalnih vrijednosti, uspoređeni su s prethodnim istraživanjima (Kostelac, 2016). Slične vrijednosti za trajanje faze prilagodbe i eksponencijalne faze rasta su dobivene u oba istraživanja. Ovdje je procijenjena veća specifična brzina rasta ovog soja i sintetizirano je nešto manje biomase nego u prethodnom radu (Kostelac 2016), a pri tome je koeficijent konverzije maltoze u biomasu bio oko tri puta manji. Ovdje bi se moglo zaključiti da održavanje kulture ovog soja u MRS-glc<sub>20</sub> podlozi utječe na fiziologiju *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> pri istovjetnim parametrima bioprocasa vođenog u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom. Valjalo bi istražiti učinkovitost potrošnje maltoze i prirast bakterijske biomase ukoliko se ova ABMK uzastopnim uzgojima prilagodi na maltozu kao jedini izvor ugljika i energije.

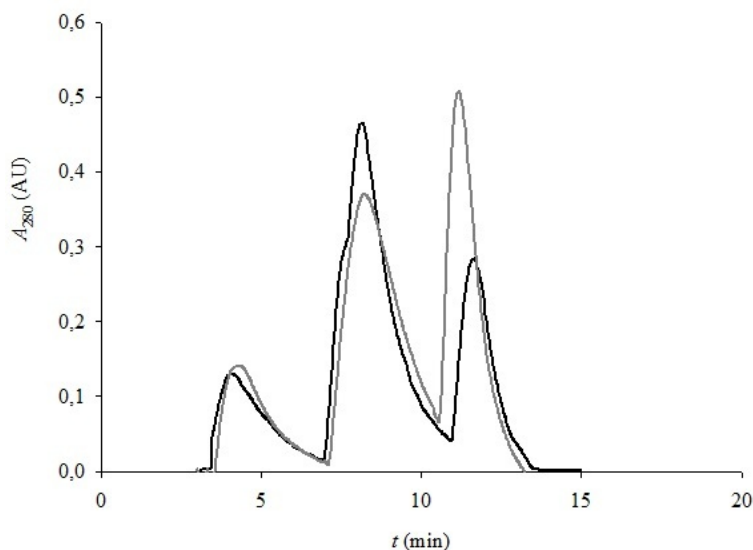
**Tablica 9.** Vrijednosti za brzinu proizvodnje mliječne kiseline ( $q_P$ ), maksimalnu koncentraciju ove kiseline ( $\gamma_{P_{max}}$ ), koeficijent konverzije maltoze u mliječnu kiselinu ( $Y_{P/S}$ ), odnos mase proizvedene mliječne kiseline i mase prirasle biomase ( $Y_{P/X}$ ) i produktivnost proizvodnje mliječne kiseline ( $Pr_P$ ) procijenjene na osnovi eksperimentalnih podataka dobivenih tijekom uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom.

proizvodnja mliječne kiseline				
$q_P$	$\gamma_{P_{max}}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$Pr_P$
(h <sup>-1</sup> )	(g <sub>P</sub> L <sup>-1</sup> )	(g <sub>P</sub> g <sub>S</sub> <sup>-1</sup> )	(g <sub>P</sub> g <sub>X</sub> <sup>-1</sup> )	(g <sub>P</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0,40	16,45	0,93	9,58	0,65

Slične vrijednost za brzinu proizvodnje mliječne kiseline i maksimalnu koncentraciju proizvedene kiseline dobivene su u ovom i prethodnom radu (Kostelac, 2016). Važno je naglasiti da je ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> gotovo stehiometrijski fermentirala maltozu do mliječne kiseline ( $Y_{P/S} = 0,93$  g g<sup>-1</sup>).

## 4.2. Izdvajanje i karakterizacija amilaze

U prethodnom istraživanju (Kostelac, 2016) afinitetnom kromatografijom izdvojena su tri proteinska pika koja su sadržavala aktivne enzime. Kako su koncentracije proteina koje su se mogle razdvojiti na ovaj način bile izuzetno male, u ovom radu za izdvajanje amilaze odabrana je ion-izmjenjivačka kromatografija. Prije kromatografskog odjeljivanja, amilaza je selektivno taložena amonijevim sulfatom i to sa tri različita zasićenja: 25, 50 i 75% (Tablica 10.). Najveću specifičnu aktivnost imala je amilaza dobivena taloženjem amonijevim sulfatom pri 75% zasićenja. Zbog toga je ova frakcija resuspendirana, odsoljena i tako dobivena otopina korištena je za odjeljivanje amilaze ion-izmjenjivačkom kromatografijom. Ovom kromatografskom metodom izdvojeno je ukupno pet proteinskih pikova (Slavica i sur., 2017) od kojih samo tri imaju amilolitičku aktivnost (Slika 11.).



**Slika 11.** Kromatogrami amilaze izdvojene iz supernatanta uzorka izuzetog nakon  $t = 8,0$  h uzgoja ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>. Izdvojena su tri proteinska pika od kojih je (s lijeva na desno) prvi eluiran pri  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl, a preostala dva, redom pri  $0,5$  i  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl u Na-acetatnom puferu,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 5,5.

Amilolitičku aktivnost imaju protein eluirani pri 0,4 mol L<sup>-1</sup> NaCl u puferu, kao i proteini eluirani pri 0,5 i 0,6 mol L<sup>-1</sup> NaCl u puferu (Tablica 10.). Ovaj zadnji eluat ima najveću specifičnu amilolitičku aktivnost.

**Tablica 10.** Pročišćavanje amilaze ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>.

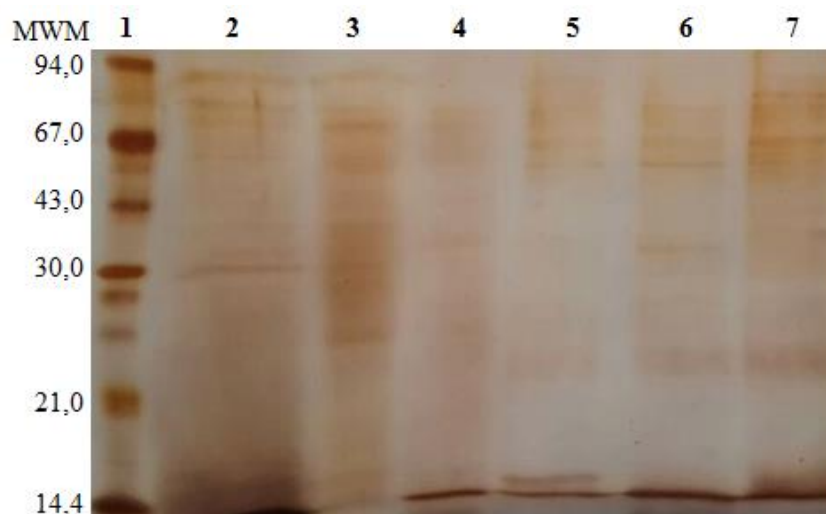
uzorak	ukupni protein (mg)	ukupna aktivnost (U*)	specifična aktivnost (U mg <sup>-1</sup> )
supernatant	6,49	773	119
25% AS	3,04	157	52
50% AS	1,30	198	153
75% AS	2,15	617	287
frakcija eluirana s 0,3 mol L <sup>-1</sup> NaCl	1,92	12	6
frakcija eluirana s 0,4 mol L <sup>-1</sup> NaCl	0,93	58	62
frakcija eluirana s 0,5 mol L <sup>-1</sup> NaCl	0,94	44	47
frakcija eluirana s 0,6 mol L <sup>-1</sup> NaCl	0,78	205	263

AS-amonijev sulfat

U\*- jedna jedinica enzimске aktivnosti je definirana kao količina amilaze koja hidrolizira 1 mmol škroba po minuti u odabranim uvjetima.

Dobiveni rezultati sasvim su u skladu s rezultatima biospecifične afinitetne kromatografije (Kostelac, 2016), kod koje su također tri aktivna proteina/enzima kromatografski izdvojena. Kromatografski postupak je ponovljen nekoliko puta i slični kromatografi su dobiveni, a dva od njih su prikazana na Slici 11.

Nakon prikupljanja frakcija, proteini su analizirani SDS-PAGE metodom (Slika 12.). Svaki proteinski pik sadrži nekoliko proteinskih vrpce molekulske mase između 50 i 94 kDa.



**Slika 12.** SDS-PAGE: standardi (MWM, 1), supernatant (2), frakcija dobivena taloženjem amonijevim sulfatom, 50% zasićenja (3), frakcija dobivena taloženjem amonijevim sulfatom, 75% zasićenja (4), frakcija eluirana s  $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (5), frakcija eluirana s  $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (6), frakcija eluirana s  $0,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  (7).

MWM-Molecular Weight Markers (kDa).

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju rezultata eksperimenta koji su opisani u ovom radu može se zaključiti slijedeće:

1. Amilolitička bakterija mliječne kiseline (ABMK) *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> uzgojena je u MRS podlozi s maltozom u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom pri konstantnoj temperaturi ( $40 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ), pH vrijednosti suspenzije ( $\text{pH } 5,5 \pm 0,2$ ) i broju okretaja miješala ( $n = 400 \text{ rpm}$ ). Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni biokinetički parametri za rast biomase i za proizvodnju mliječne kiseline s pomoću ove ABMK jasno pokazuju da je ovaj bakterijski soj izvrstan kandidat za industrijsku proizvodnju ove kiseline.
2. Maltoza inducira proizvodnju vanstanične amilaze u relativno visokim koncentracijama i zadovoljavajuće aktivnosti za provođenje izolacije i pročišćavanja ovog enzima. Proizvedena amilaza je selektivno izdvojena taloženjem amonijevim sulfatom i to pri 25, 50 i 75% zasićenja otopine ovom soli. Većina aktivne amilaze izdvojena je pri 75% zasićenja otopine amonijevim sulfatom, pa je ova frakcije korištena za daljnje pročišćavanje izdvojenog enzima.
3. Pročišćavanje resuspendirane amilaze provedeno je ion-izmjenjivačkom kromatografijom. Od ukupno pet proteinskih pikova odijeljenih tijekom eluiranja proteina s ion-izmjenjivačke kolone pomoću gradijenta otopine natrijeva klorida, samo tri proteinska pika imaju amilolitičku aktivnost. Najmanju aktivnost ima proteinski pik eluiran pri  $0,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  ( $47 \text{ U mg}^{-1}$ ), dok veću aktivnost imaju proteini eluirani pri  $0,4$  ( $62 \text{ U mg}^{-1}$ ) i  $0,6 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$  ( $263 \text{ U mg}^{-1}$ ).
4. Sve tri ion-izmjenjivačkom kromatografijom izdvojene frakcije amilaze sadrže nekoliko proteinskih vrpca, kako je to utvrđeno SDS-PAGE metodom, i to molekulskih masa između 50 i 94 kDa.

## **6. LITERATURA**



- Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects, (Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A., ured.), 3. izd., Marcel Dekker, New York, str. 1-66.
- Alikhajeh, J., Khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., Lin, Y.H., Liu, E., Guan, H.H., Hsieh, Y.C., Chuankhayan, P., Huang, Y.C., Jeyaraman, J., Liu, M.Y., Chen, C.J. (2010) Structure of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase at high resolution: implications for thermal stability. *Acta Crystallogr.* **66**, 121-129.
- Batušić, A. (2008) Utjecaj izvora ugljika na proizvodnju mliječne kiseline s pomoću bakterija *Lactobacillus delbrueckii* i *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, svibanj 2008.
- Burell, M.M. (2003) Starch: the need for improved quality or quantity - an overview. *J. Exp. Botany*, **54**, 451-456.
- De Man, J. D., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960) A medium for cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.* **23**, 130-135.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003) Microbial  $\alpha$ -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem.* **38**, 1599-1616.
- Ifuji, H., Chino, M., Kato, M., Iimura, Y. (1996) Raw-starch-digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochem J.* **318** (3), 989-996.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 524-534.
- Kostelac, D. (2016) Proizvodnja i karakterizacija  $\alpha$ -amilaze bakterije *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, srpanj 2016.

Marić, V. (2000) Biotehnologija i sirovine, 1. izd. Stručna i poslovna knjiga d.o.o., Zagreb.

Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Guyot, J. P., Sanchez, S. (2005) Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -amylases. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (1), 297-302.

Slavica, A., Inkret, I., Jakša, I., Teparić, R., Šantek, B., Novak, S. Effect of maltose on cell growth and amylase production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T, Poster Presentation, European Biotechnology Congress 2017, Dubrovnik, Hrvatska, 25-27 svibnja 2017 (<http://www.eurobiotech2017.eu>). Organized by: EBTNA (<http://www.ebtna.net>), EUROBIOTECH, University of Zagreb and other Supporting Foundations & Institutions.

Slavica, A., Trontel, A., Jelovac, N., Kosovec, Ž., Šantek, B., Novak, S. (2015) Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004<sup>T</sup> in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup>, *J. Biotechnol.* **202**, 50-59.

Sun, J., Zhao, R., Zeng, J., Li, G., Li, X. (2010) Characterization of dextrans with different dextrose equivalents. *Molecules* **15**, 5162-5173

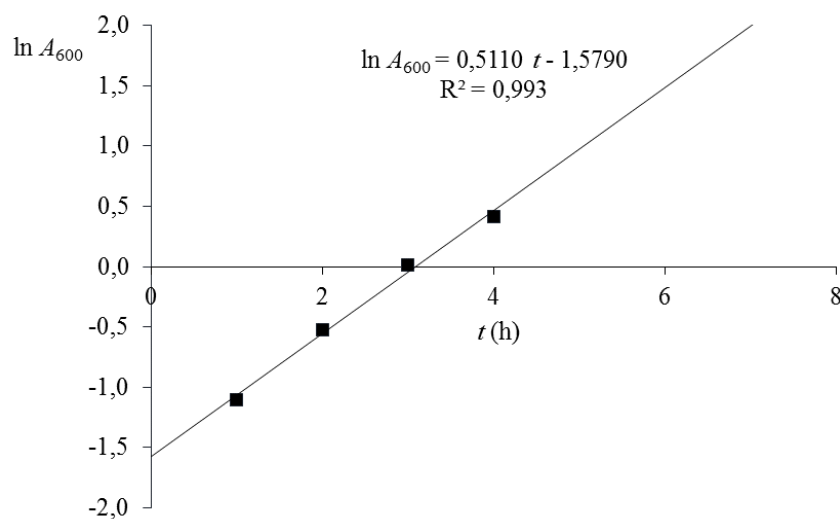
Synowiecki, J. (2007) The use of starch processing enzymes in food industry. U: Poliana J. MacCabe, A.P. (Eds.). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer, New York, NY, str. 19-34.

Taniguchi, H., Honnda Y. (2009) Amylases. U: *Encyclopedia of Microbiology, Applied Microbiology: Industrial amylases*, (Schaechter, M., Baldauf, S. L., Baross, J. A., Baulcombe, D. C., Haselkorn, R., Hopwood, D. A., Ingraham, J. L., Laskin, A. I., Levin, B. R., Schmidt, T. M., Summers, W. C., White, J. F. Jr., ured.), Elsevier Inc. New York, str.159-173.

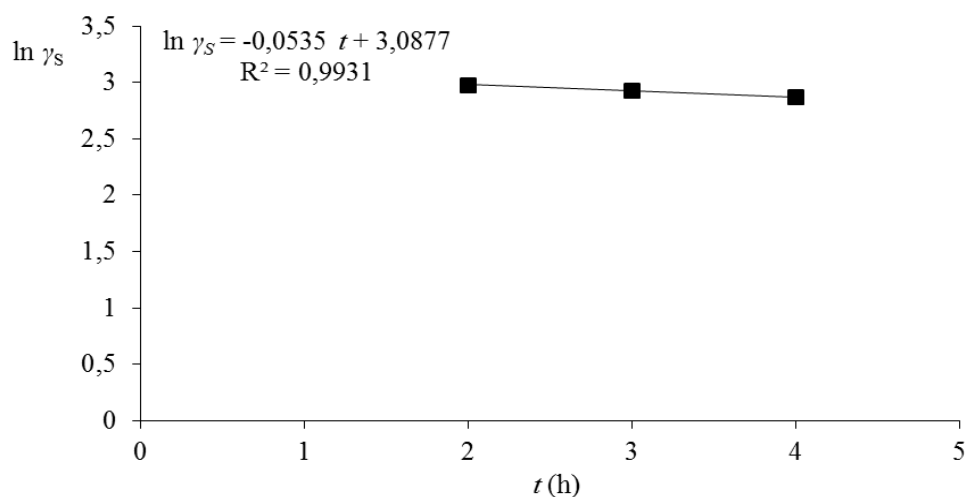
Trontel, A., Baršić, V., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2010) Modeling the effect of different substrates and temperature on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> in batch process. *Food Technol. Biotechnol.* **48**(3), 352-361.

Trontel, A.; Batušić, A., Gusić, I., Slavica, A., Šantek, B., Novak, S. (2011) Production of D- and L-lactic acid by mono- and mixed cultures of *Lactobacillus* sp. Food Technol. Biotechnol. **49**(1), 75-82.

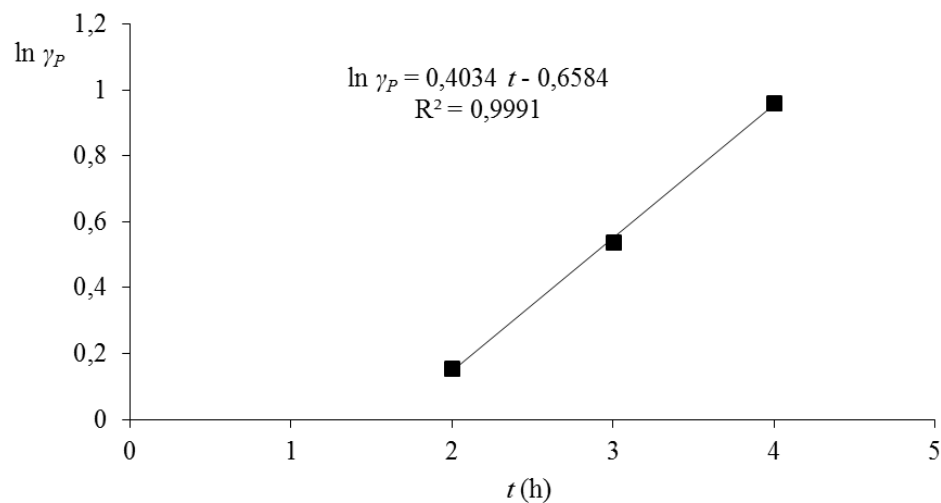
## **7. PRILOZI**



**Slika 13.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu rasta ( $\mu = 0,51 \text{ h}^{-1}$ ) ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom uzgoja u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom pri  $\theta = 40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , pH  $5,5 \pm 0,2$  i  $n = 400$  rpm.



**Slika 14.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu potrošnje maltoze ( $q_s = 0,05 \text{ h}^{-1}$ ) pomoću ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom uzgoja u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u Laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom pri  $\theta = 40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , pH  $5,5 \pm 0,2$  i  $n = 400$  rpm.



**Slika 15.** Grafički prikaz izračuna za specifičnu brzinu proizvodnje mliječne kiseline ( $q_P = 0,4 \text{ h}^{-1}$ ) pomoću ABMK *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> tijekom uzgoja u hranjivoj MRS-mal<sub>20</sub> podlozi u laboratorijskom bioreaktoru s miješalom šaržnim postupkom pri  $\theta = 40 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , pH  $5,5 \pm 0,2$  i  $n = 400 \text{ rpm}$ .